

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-121700

(43)公開日 平成 6 年(1994) 5 月 6 日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	片内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/68	Z N A A	7823-4B		
	Z	7823-4B		
C 1 2 N 15/10		8931-4B	C 1 2 N 15/ 00	A
		8931-4B		A
審査請求 未請求 請求項の数 1 (全 13 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号 特願平4-274273

(22)出願日 平成 4 年(1992)10月13日

(71)出願人 000003311

中外製薬株式会社

東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号

(72)発明者 矢ヶ崎 満郎

東京都豊島区高田 3-41-8 中外製薬株式会社内

(72)発明者 布村 清忠

東京都豊島区高田 3-41-8 中外製薬株式会社内

(74)代理人 弁理士 青木 朗 (外 4 名)

(54)【発明の名称】 C型肝炎ウイルス遺伝子の検出方法

(57)【要約】 (修正有)

【目的】 低濃度のC型肝炎ウイルスの検出方法の提供。

【構成】 被検対象物であるC型肝炎ウイルス遺伝子RNAを逆転写酵素を用いてDNAに変換した後、DNA増幅方法によりDNAを増幅し、次いで増幅されたDNAと標識DNAプローブとをハイブリダイゼーション反

(1) 5'-GAG ACT GCT AGC CGA GT# AGT GTT GGG -3'

(2) 5'-CGC TCA ATG CCT #GG AGA TTT GGG -3'

(上記配列中、#は標識結合用リンカーの結合位置を示

応に付した後、標識物質を測定する方法において、標識DNAプローブとして下記(1)または(2)に示す塩基配列からなり、かつ#で表示した箇所にリンカーを介して標識物質としてアクリジニウムN-ヒドロキシスクリンイミドエステルを結合させてなるDNA断片の何れかを使用し、ハイブリダイゼーション・プロテクション・アッセイ法により標識を検出する。

す。)

【特許請求の範囲】

【請求項1】 被検対象物であるC型肝炎ウイルス遺伝子RNAをDNAに変換し、DNAを増幅し、次いで増幅されたDNAと標識DNAプローブとをハイブリダイゼーション反応に付した後、標識物質を測定することからなる方法において、標識DNAプローブとして下記

(1) または (2) に示す塩基配列からなり、かつ#で*

(1) 5' - GAG ACT GCT AGC CGA GT# AGT GTT GGG -3' (配列番号: 1)

(2) 5' - CGC TCA ATG CCT #GG AGA TTT GGG -3' (配列番号: 2)

(上記配列中、#は標識結合用リンカーの結合位置を示す。)

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明はC型肝炎ウイルス遺伝子の検出方法に関する。詳しくはC型肝炎ウイルス遺伝子の塩基配列中、5' 側非翻訳領域の特定な塩基配列からなるDNA断片をアクリジニウムN-ヒドロキシスクシンイミドエステル (適当な標識物質) で標識した標識DNAプローブと被検物質であるC型肝炎ウイルス遺伝子とをハイブリダイゼーション反応に付したのち、ハイブリダイゼーション・プロテクション・アッセイ (Hybridization Protection Assay) (HPA) 法により標識を検出することを特徴とするC型肝炎ウイルス遺伝子の検出方法に関する。

【0002】

【発明が解決しようとする課題】C型肝炎ウイルス (HCV) の検出方法としては、当該ウイルスに対する抗原を用いて、抗原抗体反応に基づく方法により検体中のHCV抗体を検出する方法が使用されるようになってきた。しかしながらこの方法によるHCVの検出率は必ずしも満足いくものではない。上記抗原抗体反応に基づく検出方法の他に、ハイブリダイゼーション技術に基づくDNAプローブ法も検討されている。

【0003】C型肝炎患者の血清中には、 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^3$ 個/mlほどのHCVしか存在しない場合もあるといわれている。それ故、DNAプローブ法によりHCV遺伝子を検出しようとする場合には、検体中に存在するHCV遺伝子を適当なプライマーを用いてPCR法 (Michael A Inn et al. PCR Protocols. Academic Press Inc. (1989)) や3SR法 (John C Guatelli, et al. 1. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 2451-2455 (1990)) などの公知の増幅方法により増幅したのち、増幅さ

NC1領域

名称

プライマーの塩基配列

1st-PCR P-(-)246 5' -ATG AGT GTC GTG CAG CCT CCA G-3' (配列番号: 3)

P-(-)48R 5' -GGT ACT CGC AAG CAC CCT ATC A-3' (配列番号: 4)

2nd-PCR P-(-)208 5' -AGA GCC ATA GTG GTC TGC GGA A-3' (配列番号: 5)

P-(-)71R 5' -GCA GTA CCA CAA GGC CTT TCG C-3' (配列番号: 6)

【0008】

NC2領域

*表示した箇所にリンカーを介して標識物質としてアクリジニウムN-ヒドロキシスクシンイミドエステルを結合させてなるDNA断片の何れかを使用し、ハイブリダイゼーション・プロテクション・アッセイ法により標識を検出することを特徴とするC型肝炎ウイルス遺伝子の検出方法。

10*れた被検遺伝子と標識DNAプローブとをハイブリダイゼーション反応にふし、次いで標識を検出するということになる。

【0004】しかしながらHCV遺伝子は全長が約9キロbaseと極めて長い塩基配列を有しており、DNAプローブ法によりHCVを検出しようとする場合、どのような塩基配列からなるDNAプローブを用いるかという問題や、DNAプローブをどのようにして検出するかといった問題があり、実用性のあるDNAプローブ法の確立が望まれている。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らはDNAプローブ法によるHCV遺伝子の検出においては、HCV遺伝子の特異的な塩基配列がよく保存されている領域を被検対象とすることが、高い検出率を得る上で重要であると考えた。そこでHCV遺伝子において特異的な塩基配列がよく保存されているとされている5' 側非翻訳領域をコードしているHCV遺伝子 (断片) を被検対象物とするHCV検出方法の確立を目指して研究を重ねた。

【0006】この目的のために、まず検体中のHCV遺伝子断片の増幅手段としてPCR法を基本としたプライマーの設計を行い、HCV遺伝子5' 側の非翻訳領域の一部 (NC1, NC2の領域) 及び比較のため非構造領域 (NS5) の遺伝子を増幅するための下記DNA配列からなるプライマーを作製し実験に供した。非翻訳領域と非構造領域を選んだのは、この両者のいずれを被検対象物とした場合に高い検出率を得ることが出来るかを検討するためである。なお、プライマーの合成について後出実施例1に詳述する。プライマーの合成は自動DNAオリゴマー合成装置 (Applied Biosystems社) を使用した。

【0007】プライマーの塩基配列

(1) 5' 側の非翻訳領域

名称	プライマーの塩基配列
1st-PCR P-(-)208	5' -AGA GCC ATA GTG GTC TGC GGA A-3' (配列番号: 7)
P-(-)24R	5' -TGC ACG GTC TAC GAG ACC TCC C-3' (配列番号: 8)
2nd-PCR P-(-)138	5' -CAA CCC GCT CAA TGC CTG GAG A-3' (配列番号: 9)
P-(-)51R	5' -ACT CGC AGA CAC CCT ATC AGG C-3' (配列番号: 10)

【0009】(2) 非構造領域

NS 5 領域

名称	プライマーの塩基配列
1st-PCR P-6187	5' -AAC GCA TAC ACC ACA GGC CCC T-3' (配列番号: 11)
P-6493R	5' -GTG AGC ACC GCC ACG TCC GGT TC-3' (配列番号: 12)
2nd-PCR P-6253	5' -GTG GCT GCG GAG GAG TAC GTG GA-3' (配列番号: 13)
P-6421R	5' -GAA CGT GAC CTC ATC CCG CAG-3' (配列番号: 14)

【0010】DNAプローブ法において、高い検出率を得るために最も重要と考えられるポイントは、標識DNAプローブとしてどのような塩基配列のプローブを用いるかという問題と、当該標識プローブの標識の検出にあたりどのような検出方法が適当かという問題に集約されると本発明者らは考えた。

【0011】先ずDNAプローブ設計にあたっては、単離されたHCVクローン間で核酸の塩基配列を比較したとき、相当する塩基配列間の変異が少なくその配列がクローン間で良く保存されている場所がDNAプローブとして好ましいとの考えを基に検討を進めた。そしてHCV遺伝子の特異性がよく保存されている領域として一般に認識されている5'側非翻訳領域を選択した。プローブの塩基配列決定にあたっての要素としては、その領域内の配列中に含まれる塩基であるグアニン(G)とシトシン(C)の含有量(GC%)や、被検対象物であるHCV遺伝子の変異の程度を考慮して行わなければならない。

【0012】例えばHCVの5'側非翻訳領域の翻訳開始点から上流-120塩基~-100塩基の間、-222塩基~-209塩基間のようにGC%が極端に高い場所や、アデニン(A)及びチミン(T)の含有率(AT%)の高い位置はプローブの位置としては適さないことが経験的にわかる。このようなことから通常GC%が50%前後のところを標識DNAプローブの位置として選択することが最も適当と考えた。標識プローブの作製方法については後出実施例2に詳述する。更に標識DNAプローブと組合せて用いる標識の検出方法として最も適

当な方法として本発明者らはHPA法を選択した。

【0013】HPA法に適用する標識DNAプローブを設計するにあたっては、プローブがHPAのフォーマットに適したTm値(Melting Point)を持*

*つものであることが重要となる。このためにはプローブが適切なGC%を持つと同時に、適切な長さのDNA鎖からなるものであることが必要である。HPA法に用いるプローブのTmは65~70℃前後が適当であることが本発明者らの研究から明らかになっており、そのようなデザインになるように考慮しなければならない。

【0014】また、Tm値が適当であったとしてもプローブの長さが問題になり、短すぎる場合には被検物質である遺伝子DNAとのミスマッチが原因してハイブリダイゼーションがうまくいかなくなり検出できなくなる可能性がある。例えば4 baseのミスマッチを含む被検遺伝子DNAをHPA法で検出する場合、18merのプローブでは検出できないが、26merのプローブでは検出できるという場合がある。

【0015】ミスマッチを含む被検遺伝子配列を検出するためには、プローブの長さを長くすることが望ましいが、プローブが長すぎるとプローブの反応速度が遅くなるとか、Tm値がHPA法に適さなくなる等の問題点が生じ、HPA法に適した長さの標識プローブがなければ、検出率の高いDNAプローブ法を確立することは困難である。

【0016】本発明者らは以上のような状況を考慮して研究を重ねて行った結果、下記(1)または(2)に示す塩基配列からなり、且つ#で表示した位置に標識を結合させるためのリンカーを結合させ、それにアクリジニウムN-ヒドロキシスクシンイミドエステルを標識物質として結合させて作製した標識DNAプローブを使用して被検対象であるHCV遺伝子とのハイブリダイゼーション反応を行わせた後、標識をHPA法により検出することにより、HCVを極めて高い検出率で検出できるとの知見を得、この知見に基づき本発明を完成するに至った。

(1) 5' - GAG ACT GCT AGC CGA GT# AGT GTT GGG -3' (配列番号: 1)

(2) 5' - CGC TCA ATG CCT #GG AGA TTT GGG -3' (配列番号: 2)

【0017】即ち本発明は、被検対象物であるC型肝炎ウイルス遺伝子RNAを逆転写酵素を用いてDNAに変換した後、公知のDNA増幅方法によりDNAを増幅、次いで増幅されたDNAと標識DNAプローブとをハイ

*ブリダイゼーション反応に付した後、標識物質を測定することからなる方法において、標識DNAプローブとして上記(1)または(2)に示す塩基配列からなり、かつ#で表示した箇所にリンカーを介して標識物質として

アクリジニウムN-ヒドロキシスクシンイミドエステルを結合させてなるDNA断片の何れかを使用し、ハイブリダイゼーション・プロテクション・アッセイ(HPA)法により標識を検出することを特徴とするC型肝炎ウイルス遺伝子の検出方法である。なお、前記DNAプローブ(1)及び(2)の塩基配列は、Q.-L.Choo et al Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88 2451-2455 1991 に記載されているC型肝炎ウイルス遺伝子の翻訳開始コドンATGのAを1位として、それぞれ99〜74、及び133〜111の位置におよそ対応する。

【0018】本発明の方法を実施するにあたっては、先ず被検対象である血清或は肝臓組織から抽出精製したHCV由来のRNA遺伝子を逆転写酵素処理により得たDNAを、例えば自体公知のPCR法或は3SR法などの方法により増幅した後、標識DNAプローブを加えてハイブリダイゼーション反応に付す。DNAの増幅にあたりプライマーを使用するが、このプライマーは例えば本発明者らが作製した前出のプライマー「P-(-)246」、「P-(-)48R」、「P-(-)208」、「P-(-)71R」、「P-(-)138」、「P-(-)24R」、「P-(-)51R」等を用いることができる。

【0019】しかし、本発明にあつては使用できるプライマーはここに挙げたものに限定されるものではなく、前記プローブ(1)又は(2)に対応するC型肝炎ウイルス遺伝子上の部位を挟む任意の位置に対応する1対のプライマーを用いることができる。また遺伝子の増幅方法も上述のとおり公知の方法が使用可能であり、これらの方法に限定されるものではない。なお、前記プライマーにおいてPにつづく数値はQ.-L.Choo et al Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88 2451-2455 1991 に記載されているC型肝炎ウイルス遺伝子の翻訳開始コドンATGのAを1位として数えたプライマーの位置を示し、例えばP-(-)246は-246位から下流に向って伸びる塩基配列を有するプライマーを意味し、P-(-)48Rは-48位から下流に向かって伸びる塩基配列に相補的な配列を有するプライマーを意味する。また、NS5領域のプライマーにおいて、例えばP-6187は6187位から下流に向って伸びる塩基配列を有するプライマーを意味し、そしてP-6493Rは6493位から下流に向って伸びる塩基配列に相補的な配列を有するプライマーを意味する。

【0020】本発明の特徴は上記(1)、(2)に示した塩基配列を有し、#で示した特定の場所にリンカーを介してアクリジニウムN-ヒドロキシスクシンイミドエステルが標識された標識DNAプローブを用いることであり、更には、この標識DNAプローブの標識を検出する方法としてHPA法を組み合わせたことにある。

【0021】本発明で使用するプローブは自動DNAオリゴヌクレオチド合成装置を用いて合成することができ

る。また、標識物質をラベルするためのリンカーも同装置を用いてプローブ合成の際に同時に#の位置に結合させることができる。使用可能なリンカーとしては、例えばRXLリンカー(別添-1参照)や市販のAmino modifier II (Glen-Research 社)を使用することができる。リンカーの付いたプローブは精製した後、プローブのリンカー部分にアクリジニウムN-ヒドロキシスクシンイミドエステルを標識することができる。

10 【0022】標識したプローブは、逆相のカラムを用いてHPLCで精製した後、標識DNAプローブとして用いることができる。プローブの作製方法は特願昭63-508490号を参照されたい。標識を検出するための「HPA」法については、Arnoldらの報告(例えば「Clinical Chemistry (1989) vol.35; 1588-1594」、「特願昭63-508490号」)を参照されたい。

【0023】以下に実施例によって本発明を更に詳細に説明するが、これによって本発明が限定されるものではない。

20 【0024】

【実施例】

実施例1. プライマーとしてのDNA断片の塩基配列の決定と作製

C型肝炎患者(以下患者)の血清中には、 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^3$ /mlほどのHCV(Hepatitis C Virus)しか存在しない場合もあるといわれている(特願平1-500565)。それゆえに、より多くの感染者を見つけ出すにはHCV遺伝子を増幅することが必須となる。HCVはRNAウイルスであること、さらに血清中のウイルスが低濃度でもその遺伝子を増幅できるようにRT-nested PCR (Michael A Innら、PCR Protocols, Academic Press Inc. (1989))を利用した。

【0025】つまり、逆転写酵素を用いHCV RNAをDNAに変換後、入れ子のプライマーで2回PCR (Polymerase Chain Reaction)にかけHCV遺伝子を増幅した。まず、PCR増幅用のプライマーを作製するに当たり、全長約9000basesにわたるHCV遺伝子のうち、5'-noncodingとNS5の領域の遺伝子(Q.-L. Choo ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 2451-2455 (1991))を増幅するプライマーを作製した。プライマーの塩基配列の決定は次の点を考慮して行った。

【0026】1-a. 知り得るHCVクローン間で核酸の塩基配列を比較したとき、相当する塩基配列間で変異が少なく、その塩基配列がよく保存されている場所をプライマーの位置として選んだ。このとき、プライマーの塩基配列は、ターゲットとなるHCVクローン間で完全に保存されていることがもっとも望ましいが、プライマーとそれに対応するHCV遺伝子との相同性が90%程

7

度でも増幅可能である。またその相同性が70%~80%程度であってもプライマーの配列や長さを調節することにより増幅は可能である。

【0027】1-b. プライマーの長さは、15~30 bases 程度、そしてその配列中のGC%は40~70%とした。プライマーの長さは、プライマーとそれに対応するHCV遺伝子との間に予想されるミスマッチの割合やプライマーのGC%によってことなる。完全に相補的な場合には20bases 前後の長さが適当と考えた。また、プライマーの位置にターゲットの塩基配列の変異が*10

I. 5'-noncoding領域

・NC-1

名称 プライマーの塩基配列

1st-PCR P-(-)246 5'-ATG AGT GTC GTG CAG CCT CCA G-3' (配列番号:3)
P-(-)48R 5'-GGT ACT CGC AAG CAC CCT ATC A-3' (配列番号:4)
2nd-PCR P-(-)208 5'-AGA GCC ATA GTG GTC TGC GGA A-3' (配列番号:5)
P-(-)71R 5'-GCA GTA CCA CAA GGC CTT TCG C-3' (配列番号:6)

【0030】

・NC-2

名称 プライマーの塩基配列

1st-PCR P-(-)208 5'-AGA GCC ATA GTG GTC TGC GGA A-3' (配列番号:7)
P-(-)24R 5'-TGC ACG GTC TAC GAG ACC TCC C-3' (配列番号:8)
2nd-PCR P-(-)138 5'-CAA CCC GCT CAA TGC CTG GAG A-3' (配列番号:9)
P-(-)51R 5'-ACT CGC AGA CAC CCT ATC AGG C-3' (配列番号:10)

【0031】

II. NS-5領域

名称 プライマーの塩基配列

1st-PCR P-6187 5'-AAC GCA TAC ACC ACA GGC CCC T-3' (配列番号:11)
P-6493R 5'-GTG AGC ACC GCC ACG TCC GGT TC-3' (配列番号:12)
2nd-PCR P-6253 5'-GTG GCT GCG GAG GAG TAC GTG GA-3' (配列番号:13)
P-6421R 5'-GAA CGT GAC CTC ATC CCG CAG-3' (配列番号:14)

【0032】自動DNAオリゴヌクレオチド合成装置

(Applied Biosystems社 380B)で各プライマーを合成した。プライマーの精製は、OPCカラム(Applied Biosystems社 #400771)を用いその取り扱い説明書に従い行った。精製を終えたプライマーをTE (10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA※

8

*予想される場合やプライマーのGC%によっては、プライマーのTm (Melting Point) が異なるため適切な長さを検討した。

【0028】これらの条件から入れ子のプライマーセットをHCV遺伝子の5'-noncoding領域及びNS5領域から選んだ。5'-noncoding領域内に2セットおよびNS5領域内から1セット作製した。以下に入れ子のプライマーセットの各塩基配列を示す。

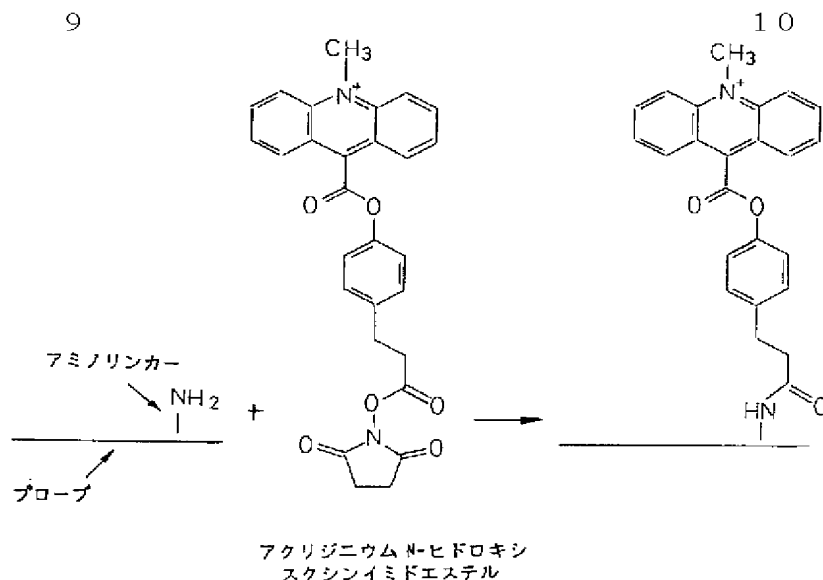
【0029】

※A)に溶かしPCRのプライマーとして用いた。

【0033】実施例2. プローブとしてのDNA断片の塩基配列の決定と標識プローブの作製

次の式(I):

【化1】



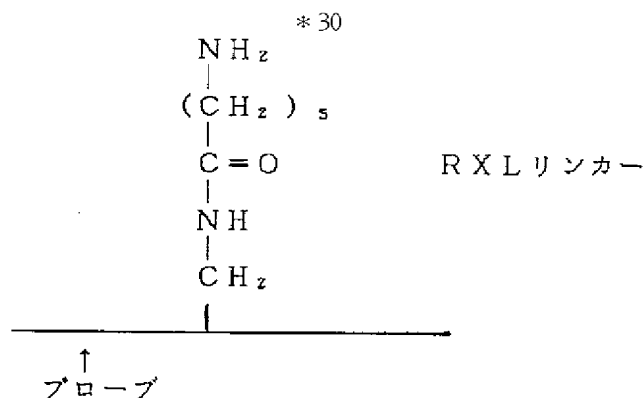
に従って化学発光物質アクリジニウムエステル (AE) でラベルしたプローブの塩基配列選定は次の基準に従い行った。

【0034】2-a. 単離されたHCVクローン間で核酸の塩基配列を比較したとき、相当する塩基配列間での変異が少なくその配列がクローン間で良く保存されている場所をプローブの位置として選んだ。プローブの塩基配列は、HCVのクローン間で完全に保存されていることが最も望ましいが、プローブとそれに対応するHCV遺伝子との相同性が90%程度でも検出可能であり、またその相同性が70%~80%程度であってもプローブの配列や長さを調節することにより検出は十分可能である。

*【0035】2-b. プローブの長さは15~40base s 程度にし、その塩基配列中のGC%が40~70%の範囲内であること。プローブの長さは、GC%や予想される遺伝子の変異によって異なるが、20~36bases 程度が適当と考えた。また、プローブの塩基配列とそれに対応するHCV遺伝子の塩基配列との間に変異が予想される場合、プローブのGC%を考慮しながらプローブの長さを調節した。

【0036】以上の条件を考慮し、プローブの塩基配列を選んだ。そのプローブの塩基配列を以下に示す。なお、プローブをAEでラベルするため、次の式(II)：

【化2】



で示されるようにRXLリンカー (特願昭63-507941) を各プローブの中央付近に挿入した。RXLリ※

※ンカーの位置は#で示した。

【0037】

I. 5'-noncoding領域

増幅位置 名称 プローブの塩基配列

NC-1 CP-(-)133 5'-CGC TCA ATG CCT #GG AGA TTT GGG -3'
(配列番号: 2)

NC-2 CP-(-)99 5'-GAG ACT GCT AGC CGA GT# AGT GTT GGG -3'
(配列番号: 1)

II. NS5領域

増幅位置	名称	プローブの塩基配列
NS	CP-10	5' -GGT GGG GGA CTT CC# ACT ACG TGA CGG GTA TGA TGA C-3' #:RXLリンカー ⁵⁾
(配列番号: 15)		

【0038】自動DNAオリゴヌクレオチド合成装置を用いてプローブを合成した。プローブをラベルするためのRXLリンカーは自動DNAオリゴヌクレオチド合成装置を用いてプローブの合成時に結合させた。今回使用したRXLリンカーのほか、市販されているリンカーであるAminomodifier II (Glen-Research社 10 #10-1950-90)を用いることも可能である。リンカーのついたプローブはOPCカラム (Applied Biosystems社 #400771)で精製した後、プローブのリンカー部分に化学発光物質であるAEを結合させた (Weeks ら、Clin. Chem. 29, 1474-1479 (1983))。その概略を以下に説明する。

【0039】RXLリンカーのついたプローブ (乾燥状態) 1nmolに、3 μ lのDimethyl sulfoxide (ナカライテスク#130-45 100 G), 2 μ lの1.6mg/mlのアクリジニウムN-ヒドロキシスクシンイミドエステル (同仁化学研究所に合成依頼)、1 μ lの1M Hepes Buffer (同仁化学研究所 #346-01373)、4 μ lのH₂Oを加え、37℃で20分間インキュベートし、AEをプローブにラベルした。インキュベート後、未反応のアクリジニウムN-ヒドロキシスクシンイミドエステルをブロックする目的で125 μ Mのグリシンを5 μ l加えて室温で5分間反応を行ない、プローブをエタノール沈殿により回収した。

【0040】AEでラベルしたプローブは、ODSカラム (東ソーTSK gel OligoDNA PRカラム#13352)を用いHPLCで精製を行なった。精製には、A液: 0.1Mトリエチルアンモニウム酢酸pH 7.0 (Applied Biosystems社 #400613)、B液: アセトニトリル (ナカライテスク#004-30SP)を用い、B液: 0→20min.、10→30% (リニアグラジエント)で分離した。以上の条件により得られたAEラベルプローブをHCV遺伝子の検出に用いた。

【0041】実施例3. PCR増幅による被検物質の検出

実施例1で示したNC-2領域のプライマーセット、すなわちP-(-)208, P-(-)24R, P-(-)138及びP-(-)51Rを用いてHCVの5'-noncoding領域の-208番目から-3番目 (HCV遺伝子の翻訳領域の最初の塩基を1番とした。)までの遺伝子配列の増幅を行った。被検物質にはHCVの5'-noncoding領域、core領域、envelope領域にまたがる約800basesの合成RNA (以下H-M800RNAと略す)を用いた。

*【0042】増幅反応は、逆転写酵素によりRNAをDNAに変換した後、入れ子のプライマーセットを用いPCR (Polymerase Chain Reaction)を2度行う方法 (RT nested PCR)により行った。増幅反応を行った1例を以下に示す。反応チューブに下記の組成で示される増幅試薬Iを入れ、ここにH-M800RNAを70, 17.5あるいは4コピー添加して全量を90 μ lとした。

【0043】増幅試薬Iの組成

10mM Tris-HCl pH8.3
0.5 μ g ランダムプライマー (TaKaRa酒造製、カタログNo. 3801)
2.5mM MgCl₂
50mM KCl
0.2mM dATP (Pharmacia 社製、カタログNo. 27-5500)
0.2mM dTTP (Pharmacia 社製、カタログNo. 27-5800)
0.2mM dGTP (Pharmacia 社製、カタログNo. 27-5700)
0.2mM dCTP (Pharmacia 社製、カタログNo. 27-5600)

【0044】この反応液を60℃で5分間インキュベーションした。反応液を室温まで冷却後、ここに1 μ lのM-MLV逆転写酵素 (200 units/ μ l BRL 社製、カタログNo. 8025SB)を添加して37℃で30分間反応してcDNAを合成した。次いで、この反応液に各々100pmolのP-(-)208, P-(-)24R Primer及び2.5UnitのTaq DNAポリメラーゼ (AmpliTaqTM, TaKaRa酒造製、カタログNo. 2531)を添加して全量を100 μ lとし、第1回目PCRを行った。

【0045】尚、PCR反応はIWAKI Thermal Sequence r TSR300型を用いて95℃、2分間の熱変性の後、95℃、1.5分、55℃、1.5分、72℃、2分の反応を40サイクル行い、さらに72℃、9分間の伸長反応を行うことにより行った。この第1回目のPCR溶液の10 μ lを出発材料として、さらにP-(-)138, P-(-)51R Primerを用いた第2回目のPCRを行った。第2回目のPCRは以下の要領で行った。すなわち、第1回目の増幅反応液の10 μ lを下記の組成で示される増幅試薬IIに添加して全量を100 μ lとした。

【0046】増幅試薬IIの組成

10mM Tris-HCl pH8.3
100pmol P-(-)138 Primer

13

100pmol P-(-)51R Primer
 2.5mM MgCl₂
 50mM KCl
 0.2mM dATP
 0.2mM dTTP
 0.2mM dGTP
 0.2mM dCTP
 2.5Unit Taq. DNAポリメラーゼ (AmpliTa
 q™)

【0047】この反応液を用いて第1回目のPCRと同
 一条件でPCRを行い核酸増幅液を得た。増幅した核酸
 は、以下に示したハイブリダイゼーション・プロテクシ
 ョン・アッセイ (HPA) 法と呼ばれる方法により検出
 した。すなわち、上記の増幅反応終了後の反応液の10
 μ lを95℃で3分間熱変性した。ここに、化学発光ラ
 ベルされたCP-(-)99プローブ (実施例2で示し
 たCP-(-)99プローブをアクリジニウムエステル
 で化学発光ラベルしたもの)を含む下記プローブ溶液9
 0 μ lを添加して60℃で20分間反応した。

【0048】次いで、ここに未反応のプローブの化学発
 光を選択的に不活性化する試薬 (0.6M Boric

Acid-182mM NaOH-1% Triton*

H-M800RNAのRT-nested PCRによる増幅

ターゲット量 (H-M800RNA コピー数)	増幅シグナル (RLUs)
0 コピー	887
4 コピー	827
17.5 コピー	84987
70 コピー	151381

RLUs: Relative Light Units (化学発光量を示す単位)

【0051】その結果、17.5コピーのH-M800
 RNAを添加した反応において、H-M800RNA無
 添加の場合の約100倍の化学発光を検出した。このこ
 とは、ここに示した核酸増幅法を用いて、17.5コピ
 ー相当の微量のRNAを検出できることを示している。

【0052】実施例4. ハイブリダイゼーション・プロ
 テクション・アッセイ (HPA) 法によるHCV遺伝子
 の検出

HPA法によりHCV遺伝子の検出が可能であることを
 検討するため、C型肝炎患者血清 (以下患者血清) から
 実施例3に記載の増幅法 (RT-nested PCR
 法)によりHCV遺伝子を増幅し、次いでHPA法を用
 いてHCV遺伝子を検出した。患者血清は、非A非B型
 肝炎と臨床診断された患者より採取した血液を常法に
 従って処理して得た。又、対照として健常人より同様の
 方法で血清を採取し、これについても検討を行った。

14

* X100)を300 μ l添加して60℃で6分間反応
 した後、残存する化学発光を測定した。尚、上記に示さ
 れた増幅された核酸を定量する方法については、Arnold
 らの報告 (特願昭63-508490及びClinical Che
 mistry (1989) vol.35; 1588-1594) に記載のハイブリ
 ダイゼーション・プロテクション・アッセイ (HPA)
 と呼ばれる方法を参照されたい。

【0049】プローブ溶液

111mM Lithium succinate buffer *

10% Lithium lauryl sulfate (Sigma #L-
 4632)

1.1mM EDTA (2Na) (ナカライ テスク #
 151-11GR)

1.1mM EGTA (Sigma #E-4378)

1 \times 10⁶ RLUs** AE-ラベルCP-133プローブ

* 1M Succinic acid (ナカライ テスク #324-02GR)

に1M Lithium hydroxide (ナカライ テスク #206-
 34EP)を滴下しpH5.2に調製したもの

** Relative Light Unitsの略 化学発光量を表す単位

【0050】上記の増幅反応により得られた結果を表1
 に示した。

【表1】

H-M800RNAのRT-nested PCRによる増幅

ターゲット量 (H-M800RNA コピー数)	増幅シグナル (RLUs)
0 コピー	887
4 コピー	827
17.5 コピー	84987
70 コピー	151381

※【0053】患者血清からのHCV RNAの抽出は以
 下の要領にて行った。すなわち、血清100 μ lにRN
 Azol™ (Biotex Lab., Inc. #CS-101) 90
 0 μ l、クロロホルム100 μ lを添加後、1分間攪拌
 して氷上に15分間放置した。14,000 \times g, 4
 °C, 10分間の遠心分離後、上清約500 μ lを採取
 し、これに2 μ lのグリコーゲン (20 μ g/ μ l B
 oehringer Mannheim #90139
 3), 2-プロパノール (ナカライ テスク#291-
 13GR) 500 μ lを添加し攪拌後、-20℃で1時
 間放置した。次いで、14,000 \times g, 4℃, 15分
 間の遠心分離を行い、上清を除去した後、ペレットを1
 mlの80%エタノール (エタノール: ナカライ テスク
 #147-13GR)で2度洗浄した。得たペレットを
 10 μ lのH₂Oに溶解してRNA試料とした。

【0054】得たRNA試料はRT-nested P

※50

CR法により増幅した。すなわち、上記のRNA抽出法により得られたRNA試料を用いて、P-(-)208, P-(-)24R, P-(-)138及びP-(-)51R Primerを用いたRT-nested PCRを行い、HCVの5'-noncoding領域の配列を増幅した。尚、増幅方法の詳細は、実施例3に示した方法に従った。

【0055】増幅した遺伝子は、以下に示したHPA法により検出した。すなわち、上記の増幅反応終了後の反応液の10 μ lを95℃で3分間熱変性した。ここに、10化学発光ラベルされたCP-(-)99プローブ（実施例2で示したCP-(-)99プローブをアクリジニウムエステルで化学発光ラベルしたもの）を含むプローブ溶液90 μ lを添加して60℃で20分間反応した（プローブ溶液の組成は実施例3参照）。次いで、ここに未*

*反応のプローブの化学発光を選択的に不活性化する試薬を300 μ l (0.6M Boric Acid, 182mM NaOH, 1% Triton X100)添加して60℃で6分間反応した後、残存する化学発光を測定した。

【0056】ここに示された増幅された遺伝子を検出する方法については、Arnoldらの報告（特願昭63-508490及びClinical Chemistry (1989) vol.35; 1588-1594）に記載のハイブリダイゼーション・プロテクション・アッセイ（HPA）と呼ばれる方法を参照された。上記の方法による患者血清からのHCV遺伝子の検出結果例を表2に示した。

【0057】

【表2】

C型肝炎患者血清からのHCVの検出

血清名	増幅シグナル(RLU)
健常人血清	265
C型肝炎患者血清 P-1	85656
C型肝炎患者血清 P-2	59047
C型肝炎患者血清 P-3	32481
C型肝炎患者血清 P-4	68829
C型肝炎患者血清 P-5	37554
C型肝炎患者血清 P-6	185275
C型肝炎患者血清 P-7	162138
C型肝炎患者血清 P-8	243675
C型肝炎患者血清 P-9	212861
C型肝炎患者血清 P-10	50350

RLUs: Relative Light Units(化学発光量を示す単位)

【0058】健常人血清において265RLUs（化学発光量を示す単位 Relative Light Units）の化学発光を得てHCV感染は陰性と判定される一方、C型肝炎患者血清においては30,000-250,000RLUsの化学発光を得てHCV感染陽性と判定された。このことは、HPA法によりC型肝炎患者のHCV遺伝子の特異的に検出できることを示している。

【0059】比較試験 本発明のプライマーおよびプローブのDNA配列が、他のDNA配列のそれらよりも優れていることを示す比較試験例

42の臨床検体からHCV RNAを抽出し、RT-nested PCR, HPA (Hybridization Protection Assay)を用い5'-noncoding領域とNS5領域間との検出率の差を比較した。100 μ lのC型肝炎患者血清に900 μ lのRNAzol™ (Biotex Lab., Inc. #CS-101), 100 μ lのクロロホルム（ナカライテスク#084-02GR）を添加後、※50

※1分間攪拌し氷上に15分間放置した。14,000 \times g, 4℃, 10分間遠心後上清約500 μ lを採取した。

【0060】これに2 μ lのグリコーゲン（20 μ g/ μ l Boehringer Mannheim #901393), 500 μ lの2-プロパノール（ナカライテスク#291-13GR）を添加後攪拌し、-20℃で1時間放置した。次に、14,000 \times g, 4℃, 15分間遠心し、上清を除去した後、ペレットを1mlの80%エタノール（エタノール：ナカライテスク#147-13GR）で2度洗浄した。このペレットを10 μ lのH₂Oに溶解しRNA溶液を得た。この10 μ lのRNAをいったん逆転写酵素でDNAに変換後、入れ子のプライマーを用いPCR (Polymerase Chain Reaction) に2回かけ増幅した（RT-nested PCR）。増幅したDNAフラグメントをHPAにかけ検出した。その概要を以下に示

す。反応チューブに下記の組成で示される増幅試薬Iを加え、ここに10 μ lのRNA溶液を添加して全量を90 μ lとした。

【0061】増幅試薬Iの組成

10mM Tris-HCl pH8.3
0.5 μ g ランダムプライマー (TaKaRa酒造製、カタログNo. 3801)
2.5mM MgCl₂
50mM KCl
0.2mM dATP (Pharmacia 社製、カタログNo. 27-5500)
0.2mM dTTP (Pharmacia 社製、カタログNo. 27-5800)
0.2mM dGTP (Pharmacia 社製、カタログNo. 27-5700)
0.2mM dCTP (Pharmacia 社製、カタログNo. 27-5600)

【0062】この反応液を60℃で5分間インキュベーションした。反応液を室温まで冷却後、ここに1 μ lのM-MLV逆転写酵素(200 units/ μ l BRL 社製、カタログNo. 8025SB)を添加し、37℃で30分間反応させcDNAを合成した。次いで、この反応液に各々100pmolの2種類のプライマー(プライマーの組み合わせは表1参照)及び2.5UnitのTaq DNAポリメラーゼ(AmpliTaq™, TaKaRa酒造製、カタログNo. 2531)を添加して全量を100 μ lとし、第1回目PCRを行った。尚、PCRの条件は次のように設定した。IWAKI Thermal Sequencer TSR300型を用いて95℃、2分間の熱変性の後、95℃、1.5分、55℃、1.5分、72℃、2分の反応を40サイクル行い、さらに72℃、9分間の伸長反応を行い終了した。

【0063】この第1回目のPCR溶液の10 μ lを出発材料として、さらに2種類のプライマー(プライマーの組み合わせは表3参照)を用いた第2回目のPCRを行った。第2回目のPCRは以下の要領で行った。すなわち、第1回目の増幅反応液の10 μ lを下記の組成で示される増幅試薬IIに添加して全量を100 μ lとした。

【0064】増幅試薬IIの組成

10mM Tris-HCl pH8.3
100pmol プライマーA (プライマーの組み合わせは

表3参照)

100pmol プライマーB (プライマーの組み合わせは表3参照)

2.5mM MgCl₂

50mM KCl

0.2mM dATP

0.2mM dTTP

0.2mM dGTP

0.2mM dCTP

2.5Unit Taq DNAポリメラーゼ (AmpliTa q™)

【0065】この反応液を用いて第1回目のPCRと同一条件でPCRを行った。増幅した遺伝子は、以下に示したハイブリダイゼーション・プロテクション・アッセイ(HPA)法と呼ばれる方法により検出した。すなわち、上記の増幅反応終了後の反応液の10 μ lを95℃で3分間熱変性した。ここに、下記プローブ溶液90 μ lを添加して60℃で20分間インキュベートした。次いで、ここに未反応のプローブの化学発光を選択的に不活性化する試薬(0.6M Boric Acid-182mM NaOH-1% Triton X100)を300 μ l添加して60℃で6分間インキュベートした後、残存する化学発光を測定した。以上のHCV遺伝子の増幅および増幅した遺伝子の検出は「実施例3」によった。PCRに使用したプライマーおよびプローブを表3にまとめた。

【0066】〔プローブ溶液〕

111mM Lithium succinate buffer *

10% Lithium lauryl sulfate (Sigma #L-4632)

1.1mM EDTA (2Na) (ナカライ テスク #151-11GR)

1.1mM EGTA (Sigma #E-4378)

1 \times 10⁶ RLUs** AE-ラベルプローブ (表1参照)

* 1M Succinic acid (ナカライ テスク #324-02GR)

に1M Lithium hydroxide (ナカライ テスク #206-34EP)を滴下しpH5.2に調製したもの

** Relative Light Unitsの略 化学発光量を表す単位

【0067】

【表3】

19 RT-nested PCRに用いたプライマーおよびHPAに用いたプローブ 20

増幅した領域	PCRに用いたプライマー		HPAに用いた プローブ
	第1回PCR	第2回PCR	
NC-1 (5'非翻訳領域)	P-(-)246	P-(-)208	CP-(-)133
	P-(-)48R	P-(-)71R	
NC-2 (5'非翻訳領域)	P-(-)208	P-(-)138	CP-(-)99
	P-(-)24R	P-(-)51R	
NS (非構造領域)	P-6187	P-6253	CP-10
	P-6493R	P-6421R	

【0068】HPAによる陽性の判定には健常人血清を利用した。つまり、健常人血清を患者血清と同様に処理し、PCRを2回かけた後HPAを行った。その際の測定値(RLU)の5倍または10倍(Cutoff値)*

*を越えたものを陽性と判定した(表4および表5)。

【0069】

【表4】

HPAによる判定結果(cutoff値: 健常人の5倍)

増幅した領域	検出率% (陽性検体数/陰性検体数)	
	第1回PCR	第2回PCR
NC-1 (5'非翻訳領域)	100.0 (42 / 42)	100.0 (42 / 42)
NC-2 (5'非翻訳領域)	100.0 (42 / 42)	100.0 (42 / 42)
NS (非構造領域)	50.0 (21 / 42)	66.7 (28 / 42)

【0070】

※ ※【表5】

HPAによる判定結果(cutoff値: 健常人の10倍)

増幅した領域	検出率% (陽性検体数/陰性検体数)	
	第1回PCR	第2回PCR
NC-1 (5'非翻訳領域)	100.0 (42 / 42)	100.0 (42 / 42)
NC-2 (5'非翻訳領域)	100.0 (42 / 42)	100.0 (42 / 42)
NS (非構造領域)	28.6 (12 / 42)	59.5 (25 / 42)

【0071】Cutoff値を健常人血清由来のRLUの10倍とした場合でも、5'非翻訳領域では第1回目のPCRで100%の検出率であった。一方、非構造領域では第2回目のPCR後、最高約70%の検出率であった。以上から明らかなように、HCV遺伝子を増幅し検出するには5'非翻訳領域が最適である。

【0072】

【配列表】

配列

GAGACTGCTA GCCGAGTXAGT GTTGGG

【0073】配列番号: 2

配列の長さ: 23

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

配列

CGCTCAATGC CTXGGAGATTT GGG

【0074】配列番号: 3

配列の長さ: 22

配列の型: 核酸

★配列番号: 1

配列の長さ: 26

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成DNA

特徴: Xはリンカーを示す。

★

26

☆トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成DNA

特徴: Xはリンカーを示す。

☆

23

◆鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

◆50 配列の種類: 合成DNA

	(12)	特開平6-121700
21	22	
配列 ATGAGTGTCTG TGCAGCCTCC AG		22
【0075】配列番号：4 配列の長さ：22 配列の型：核酸	* 鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 * 配列の種類：合成DNA	
配列 GGTACTCGCA AGCACCCTAT CA		22
【0076】配列番号：5 配列の長さ：22 配列の型：核酸	※ 鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 ※10 配列の種類：合成DNA	
配列 AGAGCCATAG TGGTCTGCGG AA		22
【0077】配列番号：6 配列の長さ：22 配列の型：核酸	★ 鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 ★ 配列の種類：合成DNA	
配列 GCAGTACCAC AAGGCCTTC GC		22
【0078】配列番号：7 配列の長さ：22 配列の型：核酸	☆ 鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 ☆20 配列の種類：合成DNA	
配列 AGAGCCATAG TGGTCTGCGG AA		22
【0079】配列番号：8 配列の長さ：22 配列の型：核酸	◆ 鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 ◆ 配列の種類：合成DNA	
配列 TGCACGGTCT ACGAGACCTC CC		22
【0080】配列番号：9 配列の長さ：22 配列の型：核酸	* 鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 * 30 配列の種類：合成DNA	
配列 CAACCCGCTC AATGCCTGGA GA		22
【0081】配列番号：10 配列の長さ：22 配列の型：核酸	※ 鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 ※ 配列の種類：合成DNA	
配列 ACTCGCAGACA CCCTATCAG GC		22
【0082】配列番号：11 配列の長さ：22 配列の型：核酸	★ 鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 ★40 配列の種類：合成DNA	
配列 AACGCATACA CCACAGGCC CT		22
【0083】配列番号：12 配列の長さ：23 配列の型：核酸	☆ 鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 ☆ 配列の種類：合成DNA	
配列 GTGAGCACCG CCACGTCCG TTC		23
【0084】配列番号：13 配列の長さ：23 配列の型：核酸	◆ 鎖の数：一本鎖 トポロジー：直鎖状 ◆50 配列の種類：合成DNA	

	(1 3)	特開平 6 - 1 2 1 7 0 0
2 3		2 4
配列		
GTGGCTGCGG AGGAGTACGT GGA		23
【 0 0 8 5 】配列番号： 1 4	* 鎖の数：一本鎖	
配列の長さ： 2 1	トポロジー：直鎖状	
配列の型：核酸	* 配列の種類：合成DNA	
配列		
GAACGTGACC TCATCCCGCA G		21
【 0 0 8 6 】配列番号： 1 5	※トポロジー：直鎖状	
配列の長さ： 3 6	配列の種類：合成DNA	
配列の型：核酸	10 特徴：Xはリンカーを示す	
鎖の数：一本鎖	※	
配列		
GGTGGGGGAC TTCCXACTACG TGACGGGTAT GATGAC		36

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/51				
C 1 2 Q 1/70		7823-4B		